伦蒂南对亚砷酸钠诱导 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积的拮抗效应研究

杨 渊 *，符锦玉，龚亚波，戴宗英

广西全生命周期健康与保健研究重点实验室，桂林医学院公共卫生学院，桂林 541199

[摘要] 目的 探讨伦蒂南（香菇多糖，Lentinan, LNT）对亚砷酸钠（sodium arsenite, SA）诱导 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积的干预效应。**方法** 实验分为 4 组（8 只/组）：分别为对照组、亚 SA 染毒组、LNT 干预+SA 染毒组、LNT 对照组，对 C57BL/6 小鼠进行 SA 染毒处理（SA 溶于去离子水，10.0 mg/L 饮用水暴露，8 周）以及 LNT 干预处理（1.0 mg/kg，肌肉注射，隔日一次，8 周），实验结束后收集肝组织样本，通过肝组织切片油红 O 染色观察肝脏脂质沉积特征，应用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测小鼠肝组织甘油三酯（TG）和脂联素（APN）水平，应用方差分析和最小显著差异法（LSD）检验比较组间统计学差异。 **结果** 相比对照组，SA 染毒组小鼠显示肝组织脂质沉积，APN 水平下降，而 TG 水平上调（P<0.05）。相比 SA 染毒组，LNT 干预后显示肝脏脂质沉积程度减轻，APN 水平升高，而 TG 水平下调（P<0.05）。对于 LNT 对照组，与对照组类似，肝脏组织形态正常，APN 和 TG 水平与对照组相比无统计学差异（P>0.05）。 **结论** SA 诱导 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积可能与 APN 水平下调有关，LNT 干预可升高 APN 水平以拮抗 SA 诱导的 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积。

[关键词] 亚砷酸钠；肝脏脂质沉积；伦蒂南；拮抗效应

中图分类号: R114

作者简介：杨渊，男（1977 年），苗族，博士、教授，主要从事环境毒理学研究。

基金项目：湖南省自然科学基金（2021JJ30484，2022JJ30426）

通讯作者：yang1977yuan@126.com

Antagonistic effect of Lentinan on liver lipid deposition induced by sodium arsenite in C57BL/6 mice

Yang Yuan *, Fu Jinyu, Gong Yabo, Dai Zongying

Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposure Omics and Life Cycle Health, School of Public Health, Guilin Medical College, Guilin 541199, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the intervention effect of Lentinan (LNT) on liver lipid deposition induced by sodium arsenite (SA) in C57BL/6 mice. **Methods** The experiment was divided into four groups (8 mice/group): control group, SA exposure group, LNT intervention+SA exposure group, LNT control group. C57BL/6 mice were exposed by SA (SA dissolved in deionized water, drinking water exposure 10.0 mg/L, 8 weeks) and LNT intervention treatment (1.0 mg/kg, intramuscular injection, once every other day, 8 weeks). After the experiment, liver tissue samples were collected and the characteristics of liver lipid deposition were observed by oil red O staining of liver tissue sections. The levels of triglyceride (TG) and adiponectin (APN) in the liver tissue of mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the statistical differences between the groups were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and least significant difference (LSD). **Results** Compared with control group, SA exposure mice showed that lipid deposition in liver tissues, decreased APN level, and increased TG level ($P<0.05$). Compared with SA exposure group, LNT intervention+SA exposure group showed that the reduced degree of liver lipid deposition, the increased level of APN, and the decreased level of TG ($P<0.05$). For LNT control group, similar to the control group, the liver tissue morphology was normal, and the levels of APN and TG had no statistical difference compared with the control group ($P>0.05$). **Conclusion** SA-induced liver lipid deposition in C57BL/6 mice may be related to the down-regulation of APN level. LNT intervention can increase APN level to antagonize SA-induced liver lipid deposition in C57BL/6 mice.

[**Keywords**] Sodium arsenite; Liver lipid deposition; Lentinan; Antagonistic effect

The first author: Yang Yuan, male (1977), Miao nationality, doctor, professor, engaged in environmental toxicology research.

Foundation: Hunan Natural Science Foundation (2021J30484; 2022J30426)

To whom correspondence should be addressed: yang1977yuan@126.com

砷作为一种环境高毒性化学污染物，可通过土壤、饮用水或食物污染，经消化道摄入而导致肝毒性，与非酒精性脂肪肝病、2 型糖尿病、心血管疾病等慢性病发生风险增加密切相关[1-2]。实验发现，砷暴露可诱导小鼠肝脏胰岛素抵抗、肝细胞脂肪变性和肝脏脂质沉积[3]，但其内在的分子调控机制尚不清楚。脂联素（APN）是由人体脂肪细胞、肝细胞等多种细胞分泌的一种 30 kDa 小分子蛋白[4]，既往研究发现 APN 可激活 AMP 活化蛋白激酶（AMP activated protein kinase, AMPK），诱导线粒体脂肪酸代谢酶如肉碱棕榈酰转移酶 1（carnitine palmitoyl transferase 1, CPT-1）表达，促进线粒体脂肪酸 β 氧化代谢[5-6]。因此，肝细胞线粒体功能障碍可导致脂肪酸 β 氧化障碍，细胞内游离脂肪酸（FFAs）不能被氧化而通过酯化为甘油三酯（TG），从而以脂肪滴的形式积聚在肝细胞中，与肝脏脂肪变性密切相关[7]。为探讨 APN 在砷诱导的肝脏脂质沉积中的作用及其机制，本研究以 C57BL/6 小鼠为实验对象，应用亚砷酸钠（sodium arsenite, SA）染毒，以香菇多糖（Lentinan, LNT）作为干预剂，探讨 LNT 对其诱导肝脏脂质沉积的干预效应及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 试剂：亚砷酸钠（Sodium arsenite, 缩写为 SA，分子式 $NaAsO_2$，CAS.7784-46-5, Sigma-Aldrich，USA）；香菇多糖（LNT, CAS.37339-90-5，上海笃玛生物技术有限公司）；Ⅱ型胶原酶（C2-BIOC，Sigma-Aldrich，USA）；ELISA 检测试剂盒：APN（SEA605Hu，上海钰博生物）；甘油三酯(TG)（YKW-20336，上海优科唯生物）。仪器：光学显微镜（DMB5-2231P1，厦门 Motic 实业集团有限公司）；800 TS 吸收光酶标仪（美国 BioTek 公司）。

1.2 实验动物分组与处理 本实验方案经桂林医学院实验动物伦理委员会（GLMC202203268）批准。C57BL/6 雄性小鼠 24 只购自长沙斯莱克实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0004，体重范围（26.4±1.1）g，鼠龄 9～10 周。实验分为 4 组（n=6/组），分别为：（1）对照组：用去离子水作为饮用水常规喂养小鼠；（2）SA 染毒组：SA 溶于去离子水稀释至 10.0 mg/L，饮用水暴露，8 周；（3）LNT 干预+SA 染毒组：LNT 干预，LNT 溶于去离子水，剂量为 1.0 mg/kg，小鼠隔日一次肌肉注射 LNT，8 周；SA 染毒方法同（2）；（4）LNT

对照组：LNT 溶于去离子水，剂量为 1.0 mg/kg，小鼠隔日一次肌肉注射 LNT，8 周。实验结束后，用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉并处死小鼠，随后采集分离小鼠肝组织，肝组织一部分用 4%多聚甲醛固定，然后进行冰冻切片和油红 O 染色，显微镜下观察肝组织脂质沉积特征。

1.3　指标与方法

1.3.1　肝组织脂质沉积评价　小鼠肝组织样本经甲醛固定 72 h 后，经 OCT 冰冻切片包埋剂包埋后并制备 5 μm 冰冻切片，然后进行油红 O 染色，在显微镜下评价肝组织脂质沉积特征，肝脏组织中桔红色颗粒或团块代表脂肪颗粒或脂质沉积，蓝色代表细胞核着色。

1.4 肝组织 TG、APN 含量检测　小鼠肝组织剥离后，用 PBS 缓冲液冲洗以除去残余血液，然后用 Dounce 匀浆器（10% w/v）制备肝组织匀浆，并加入含有 0.05% Ⅱ型胶原酶的 RPMI 培养基在 37 ℃下孵育 30 分钟，经反复冻融后肝细胞充分裂解，然后在 1500×*g* 条件下低温离心 10 分钟，收集上清液后按 ELISA 试剂盒操作说明书操作进行 TG 和 APN 含量检测，通过酶标仪计检测的 OD 值通过标准曲线换算为 mmol/L 或 ng/mL 浓度。

1.5 统计分析　实验数据以平均值±标准差（SD）表示，应用统计软件 SPSS V23.0 进行数据分析。组间统计学差异通过单因素方差分析（ANOVA）检验和最小显著性差异（LSD）法进行比较评估，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义检验水准。

2　结　果

2.1　香菇多糖对亚砷酸钠诱导肝脏脂质沉积的改善效应（图 1）　如图 1 所示，小鼠 SA 饮用水暴露 8 周后，肝组织切片油红 O 染色显示肝组织脂质沉积特征，脂质呈颗粒或团块样散在于肝细胞内、细胞周围及小叶间隙，肝细胞核部分不规则，部分区域肝细胞消失以及肝细胞边界不清楚。与 SA 染毒组相比，香菇多糖（LNT）干预后显示肝组织脂质沉积减轻特征，肝组织细胞脂质分布减少，肝细胞病理损害程度减轻。

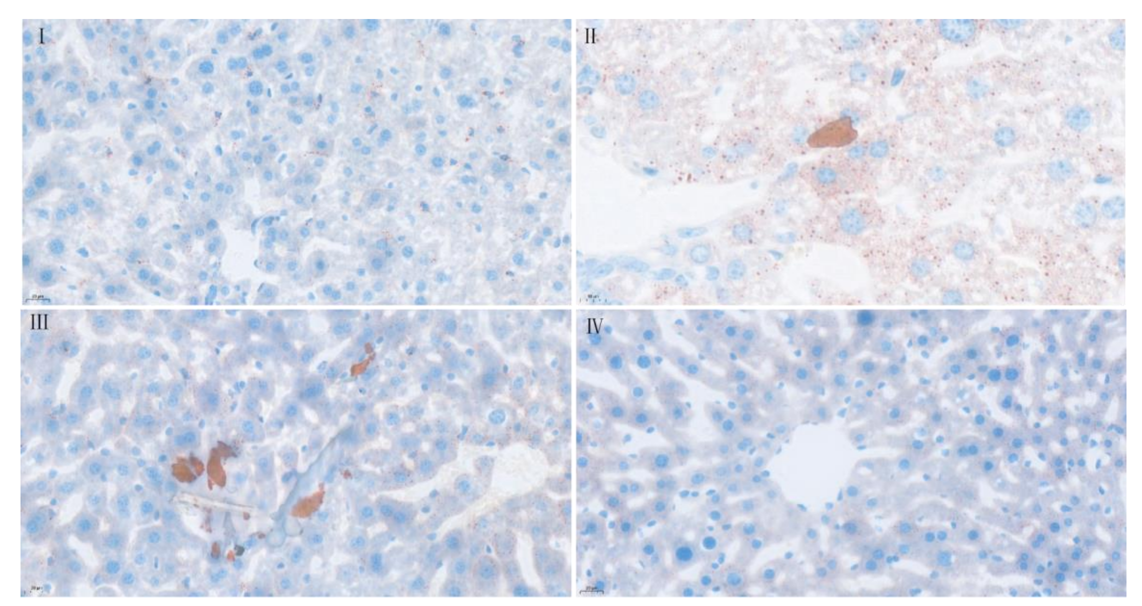


图 1. LNT 对 SA 诱导 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积的拮抗效应

注：Ⅰ，对照组；Ⅱ，SA 染毒组；Ⅲ，LNT 干预+SA 染毒组；Ⅳ，LNT 对照组。

2.2 香菇多糖对 SA 诱导小鼠肝组织 TG 和 APN 含量的影响 与对照组比较，SA 染毒组小鼠肝组织 TG 含量明显升高，APN 水平明显降低（P＜0.05）；与 SA 染毒组比较，LNT 干预后小鼠肝组织 TG 含量降低，而 APN 水平上调（P<0.05），详见表 1。

表 1 香菇多糖干预对 SA 染毒小鼠肝组织 TG 和 APN 含量的影响

指标(单位)	对照组	SA 染毒组	LNT 干预＋SA 染毒组	LNT 对照组
TG (mmol/L)	2.21±1.08	9.83±2.72 [a]	3.21±1.38 [b]	2.89±1.25
APN (ng/ml)	976.04±259.52	359.90±134.45 [a]	873.89±242.25 [b]	911.31±168.71

.**注:**数据用 $\bar{\chi}$±SD 表示, n=6。[a] 指与对照组比较，差异有统计学意义（P<0.05）；[b] 与 SA 染毒组比较，差异有统计学意义（P<0.05）。

讨　论

流行病学研究显示，环境砷暴露可导致人群非酒精性脂肪肝病、糖尿病发生

风险升高[8]，而且，职业性砷暴露人群中亦发现肝脏脂肪沉积的影像学证据[9]。体外实验发现，线粒体脂质代谢障碍是细胞内脂质沉积发生的重要病理机制[10]，而 APN 作为一种小分子活性蛋白，具有抑制细胞内脂质合成[11]、以及抗氧化、抗炎效应[7]。本研究发现，砷染毒可诱导 C57BL/6 小鼠发生肝脏脂质沉积，TG 含量升高和 APN 水平下降的毒性特征，而 LNT 的干预对砷诱导的肝脏脂质沉积效应呈现出明显拮抗效应，由此提示，LNT 拮抗砷诱导 C57BL/6 小鼠肝脏脂质沉积效应与 APN 信号有关。

香菇多糖（*Lentinan*, LNT）是食用菌香菇（*Lentinus edodes*, L.edodes）中分离的 β-1,6;1,3-葡聚糖结构活性多糖，具有较高的抗氧化能力[12]和诱导宿主免疫反应和免疫调节活性[13]。例如，LNT 显著降低消化道癌症患者体内 $CD4^+IL\text{-}4^+T$ 细胞和 $CD4^+IL\text{-}6^+T$ 细胞的百分比含量[14]；LNT 可减少氧化应激产物 MDA 生成和增加细胞抗氧化酶 SOD 活性[12]；LNT 可改善细胞氧化应激，能修复紫杉醇诱导小鼠骨髓细胞 DNA 损伤和细胞凋亡[15]。近来发现，LNT 具有改善砷诱导肝脏病理损害[16]，减轻高脂诱导的非酒精性脂肪肝病（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）小鼠肝脏脂肪变性[17]和大鼠酒精性肝损伤保护效应[18]。本研究结果表明，LNT 对砷诱导的肝脏脂质代谢障碍具有改善效应，其特征是肝组织油红 O 染色显示脂质沉积程度减轻，TG 含量降低和 APN 水平升高。

综上，本研究通过体内实验证实了砷暴露与肝脏脂质沉积之间的因果关系，APN 通过下游信号通路拮抗砷暴露诱导肝脏脂质沉积，提示存在于人体外周血中的 APN 水平，对于维护机体肝脏脂质代谢功能具有重要价值。未来可进一步通过砷暴露和 rAPN 干预的动物实验，以进一步探索 APN 信号通路拮抗肝脏脂肪变的分子机制。

参考文献

[1] Roychowdhury T, Uchino T, Tokunaga H, et al. Survey of arsenic in food composites from an arsenic-affected area of West Bengal, India[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(11):1611-1621.
[2] Frediani JK, Naioti EA, Vos MB, Figueroa J, Marsit CJ, Welsh JA. Arsenic exposure and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) among U.S. adolescents and adults: an association modified by race/ethnicity, NHANES 2005-2014. *Environmental Health*, 2018, 17(1): 6.
[3] Qiu T, Pei P, Yao X, et al. Taurine attenuates arsenic-induced pyroptosis and nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting the autophagic-inflammasomal pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 946.

[4] Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function[J]. Compr Physiol, 2018, 8(3): 1031-1063.
[5] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(2): 121-135.
[6] Yadav A, Kataria MA, Saini V, et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance[J]. Clin Chim Acta, 2013, 41(7): 80-84.
[7] Dong Z, Zhuang Q, Ye X, et al. Adiponectin Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation in Nonalcoholic Steatohepatitis via AMPK-JNK/ErK1/2-NFκB/ROS Signaling Pathways[J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 546445.
[8] 宋选波，赵丽军，魏育丹. 砷暴露与糖、脂代谢关系的研究进展[J]. 中华地方病学杂志，2018，37（2）： 165-168.
[9] 梅靖，郑勇. 砷中毒与非砷中毒以及脂肪肝患者其肝实质超声声像图差异[J]. 中国地方病防治杂志，2018，33(4)：448.
[10] Zhang DG, Zhao T, Hogstrand C, et al. Oxidized fish oils increased lipid deposition via oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and the CREB1-Bcl2-Beclin1 pathway in the liver tissues and hepatocytes of yellow catfish. Food Chem, 2021, 360: 129814.
[11] Chen H, Zhang L, Li X, et al. Adiponectin activates the AMPK signaling pathway to regulate lipid metabolism in bovine hepatocytes[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 138: 445-454.
[12] Zi Y, Zhang B, Jiang B, et al. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2018, 17(6): 1108-1114.
[13] Xu X, Yan H, Tang J, et al. Polysaccharides in Lentinus edodes: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2014, 54(4): 474-487.
[14] Yoshino S, Tabata T, Hazama S, et al. Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers[J]. Anticancer Research, 2000, 20(6C): 4707-4711.
[15] Attia SM, Harisa GI, Abd-Allah AR, et al. The influence of lentinan on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by paclitaxel in mouse bone marrow cells[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2013, 27(7): 370-377.
[16] Yang Y, Song S, Nie Y, Chen R, Chen P. Lentinan alleviates arsenic-induced hepatotoxicity in mice via downregulation of OX40/IL-17A and activation of Nrf2 signaling. BMC Pharmacol Toxicol. 2022, 23(1):16.
[17] Yang X, Zheng M, Zhou M, Zhou L, Ge X, Pang N, Li H, Li X, Li M, Zhang J, Huang XF, Zheng K, Yu Y. Lentinan Supplementation Protects the Gut-Liver Axis and Prevents Steatohepatitis: The Role of Gut Microbiota Involved. Front Nutr. 2022, 8:803691.
[18] 周博宇, 孙兰, 隋自洁,等. 香菇多糖对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中国卫生工程学, 2022(021-001).